

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/008469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/67 C12P21/02 C12N1/21
//(C12N1/21,C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/053582 A (POST GENOME INST CO LTD) 11 July 2002 (2002-07-11) abstract page 6, line 17 - line 23 page 7, line 10 - page 8, line 1 page 13, line 3 - line 16 page 21, line 18 - page 22, line 3 page 27, line 12 - line 17	1-12
X	SHIMIZU Y ET AL: "CELL-FREE TRANSLATION RECONSTITUTED WITH PURIFIED COMPONENTS" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 19, August 2001 (2001-08), pages 751-755, XP001060378 ISSN: 1087-0156 cited in the application the whole document	1-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 November 2004

Date of mailing of the international search report

16/12/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Huse, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/008469

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHORT GLENN F III ET AL: "Effects of release factor 1 on in vitro protein translation and the elaboration of proteins containing unnatural amino acids" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, PA, US, vol. 38, no. 27, 6 July 1999 (1999-07-06), pages 8808-8819, XP002195367 ISSN: 0006-2960 cited in the application abstract -----	1-12
A	LAMLA T ET AL: "The cell-free protein biosynthesis--applications and analysis of the system." ACTA BIOCHIMICA POLONICA. 2001, vol. 48, no. 2, 2001, pages 453-465, XP002307274 ISSN: 0001-527X abstract page 455, right-hand column, paragraph 2 page 457, right-hand column, line 30 - line 32 page 458, left-hand column, line 18 - line 22 -----	1-12
A	WO 90/05785 A (UNIV CALIFORNIA) 31 May 1990 (1990-05-31) abstract page 2, line 36 - page 3, line 10 page 30, line 33 - page 31, line 1 page 31, line 18 - line 23 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/008469

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02053582	A	11-07-2002	JP 2003102495 A	08-04-2003
			CA 2400735 A1	11-07-2002
			DE 1319074 T1	27-11-2003
			EP 1319074 A2	18-06-2003
			ES 2193896 T1	16-11-2003
			HU 0301723 A2	28-08-2003
			WO 02053582 A2	11-07-2002
			NO 20024082 A	27-08-2002
			SK 10862002 A3	01-04-2003
			TR 200301277 T3	21-11-2003
			US 2002123101 A1	05-09-2002
WO 9005785	A	31-05-1990	AU 649217 B2	19-05-1994
			AU 4741290 A	12-06-1990
			AU 636323 B2	29-04-1993
			AU 4810290 A	12-06-1990
			CA 2003273 A1	18-05-1990
			EP 0445214 A1	11-09-1991
			EP 0446299 A1	18-09-1991
			JP 4504651 T	20-08-1992
			JP 4504711 T	20-08-1992
			WO 9005785 A1	31-05-1990
			WO 9005746 A1	31-05-1990
			US 5215889 A	01-06-1993
			US 5190865 A	02-03-1993
			US 5302516 A	12-04-1994
			US 5314817 A	24-05-1994
			US 5298409 A	29-03-1994

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C12N15/67 C12P21/02 C12N1/21
 //(C12N1/21, C12R1:19)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/053582 A (POST GENOME INST CO LTD) 11. Juli 2002 (2002-07-11) Zusammenfassung Seite 6, Zeile 17 - Zeile 23 Seite 7, Zeile 10 - Seite 8, Zeile 1 Seite 13, Zeile 3 - Zeile 16 Seite 21, Zeile 18 - Seite 22, Zeile 3 Seite 27, Zeile 12 - Zeile 17	1-12
X	SHIMIZU Y ET AL: "CELL-FREE TRANSLATION RECONSTITUTED WITH PURIFIED COMPONENTS" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, Bd. 19, August 2001 (2001-08), Seiten 751-755, XP001060378 ISSN: 1087-0156 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. November 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16/12/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Huse, I

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SHORT GLENN F III ET AL: "Effects of release factor 1 on in vitro protein translation and the elaboration of proteins containing unnatural amino acids" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, PA, US, Bd. 38, Nr. 27, 6. Juli 1999 (1999-07-06), Seiten 8808-8819, XP002195367 ISSN: 0006-2960 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung -----	1-12
A	LAMLA T ET AL: "The cell-free protein biosynthesis--applications and analysis of the system." ACTA BIOCHIMICA POLONICA. 2001, Bd. 48, Nr. 2, 2001, Seiten 453-465, XP002307274 ISSN: 0001-527X Zusammenfassung Seite 455, rechte Spalte, Absatz 2 Seite 457, rechte Spalte, Zeile 30 - Zeile 32 Seite 458, linke Spalte, Zeile 18 - Zeile 22 -----	1-12
A	WO 90/05785 A (UNIV CALIFORNIA) 31. Mai 1990 (1990-05-31) Zusammenfassung Seite 2, Zeile 36 - Seite 3, Zeile 10 Seite 30, Zeile 33 - Seite 31, Zeile 1 Seite 31, Zeile 18 - Zeile 23 -----	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

POA/EP2004/008469

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 02053582	A	11-07-2002	JP	2003102495 A	08-04-2003
			CA	2400735 A1	11-07-2002
			DE	1319074 T1	27-11-2003
			EP	1319074 A2	18-06-2003
			ES	2193896 T1	16-11-2003
			HU	0301723 A2	28-08-2003
			WO	02053582 A2	11-07-2002
			NO	20024082 A	27-08-2002
			SK	10862002 A3	01-04-2003
			TR	200301277 T3	21-11-2003
			US	2002123101 A1	05-09-2002
<hr/>					
WO 9005785	A	31-05-1990	AU	649217 B2	19-05-1994
			AU	4741290 A	12-06-1990
			AU	636323 B2	29-04-1993
			AU	4810290 A	12-06-1990
			CA	2003273 A1	18-05-1990
			EP	0445214 A1	11-09-1991
			EP	0446299 A1	18-09-1991
			JP	4504651 T	20-08-1992
			JP	4504711 T	20-08-1992
			WO	9005785 A1	31-05-1990
			WO	9005746 A1	31-05-1990
			US	5215889 A	01-06-1993
			US	5190865 A	02-03-1993
			US	5302516 A	12-04-1994
US	5314817 A	24-05-1994			
US	5298409 A	29-03-1994			
<hr/>					

Verfahren zur Herstellung eines Lysates zur zellfreien Proteinbiosynthese

5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Lysates sowie eine Verwendung des Lysates, wobei das Lysat eine geringe Aktivität essentieller Translationsprodukte
10 aufweist, zur zellfreien Proteinbiosynthese von synthetischen Proteinen.

Hintergrund der Erfindung

15

Proteine werden für biotechnologische und medizinische Anwendungen in hoher Reinheit, insbesondere aber auch in hoher Menge benötigt. Meist ist eine klassische Synthese kaum möglich, jedenfalls in der Regel unwirtschaftlich.
20 Dies betrifft besonders die Herstellung modifizierter Proteine bzw. von Proteinen, die nicht-natürliche Aminosäuren enthalten.

Eine Möglichkeit der Herstellung von Proteinen in größerem
25 Maßstab ist die gentechnische Herstellung. Hierzu wird klonierte DNA, welche für das gewünschte Protein codiert, als fremde DNA in Form von Vektoren bzw. Plasmiden in Zellen, insbesondere prokaryontische Zellen, eingeschleust. Diese Zellen werden dann kultiviert, wobei die durch die
30 fremde DNA codierten Proteine exprimiert und gewonnen werden. Zwar lassen sich auf diesem Wege bereits gesteigerte Mengen an Protein gewinnen, die insofern bekannten Maßnahmen, insbesondere die Klonierung, sind jedoch aufwendig.

Zudem sind die Zellen meist nur transient transfiziert und nur in Ausnahmefällen stabil immortalisiert. Desweiteren beherbergt die in vivo Proteinbiosynthese mehrere Nachteile: Das zelleigene Expressionssystem unterdrückt
5 die Expression heterologer Genstrukturen oder entsprechende mRNA oder Genprodukte sind instabil oder werden durch intrazelluläre Nukleasen bzw. Proteasen zerstört. Bei toxischen Endprodukten führt die Expression zur Hemmung oder gar zum Absterben des Organismus. Diese Probleme
10 führen dazu, dass eine deutliche Überproduktion des erwünschten Proteins kaum möglich ist.

Die zellfreie Proteinbiosynthese stellt eine effektive Alternative zur Synthese von Proteinen durch genetisch
15 veränderte Organismen dar, da hier die obengenannten Phänomene vermeidbar sind. Bekannte zellfreie Proteinbiosynthesesysteme sind Lysate von Kaninchenreticulocyten, aus Weizenkeimlingen und bakteriellen S30-Extrakten. Methoden zur Herstellung eines Lysates sind dem Fachmann wohl
20 bekannt. Jedoch weiterhin problematisch bei der Verwendung eines Lysates ist, dass im Lysat Komponenten enthalten sein können, welche störend in die Produktion des gewünschten Proteins eingreifen und somit die Ausbeute reduzieren. Der negative Effekt solcher Komponenten kann
25 durch deren Inhibierung oder Entfernung aus dem Lysat unterbunden werden. Störende Aktivitäten werden bei der Herstellung von Lysaten allein dadurch entfernt, dass der Inhalt der Zelle im Verlauf der Aufarbeitung der für die Proteinbiosynthese wichtigen Komponenten fraktioniert
30 wird. Während dieses Prozesses werden beispielsweise Membran- und Zellwandkomponenten, ein großer Teil der chromosomalen DNA sowie niedermolekulare Komponenten abgetrennt. Verbliebene Aktivitäten müssen in weiteren Aufarbeitungs-

schritten beseitigt oder vorab durch genetische Modifizierung des Organismus verhindert werden.

Aus der Literaturstelle US 6,337,191 ist die Verwendung
5 eines Lysates zur Herstellung von Proteinen mit einem verbesserten Energieregenerierungssystem, in welchem optional störende Enzymaktivitäten durch Inhibierung oder Entfernung der unerwünschten Enzyme zusätzlich eliminiert werden, bekannt. Mögliche Methoden sind das
10 Knockoutverfahren, Antisense- oder weitere bekannte Verfahren zur Entfernung von Proteinen, wie Affinitätschromatographien.

Auch sind Lysate aus gentechnisch veränderten Zellstämmen
15 bekannt, welche defizient an bestimmten Aktivitäten sind. Beispielhaft sei hier der genetisch veränderte E. coli-Stamm EcoPro T7 der Firma Novagen genannt, welcher defizient an den Proteasen lon und ompT ist.

20 In besonderen Fällen ist das die in vitro Proteinbiosynthese störende Protein für das Wachstum des Organismus unerlässlich. Eine Inaktivierung des Enzyms führt zwangsläufig zum Absterben des Organismus. In solchen Fällen ist das Enzym nachträglich zu inaktivieren oder zu entfernen. Die bereit genannte Literaturstelle US 6,337,191
25 gibt hierzu diverse Methoden an.

Im Wege der zellfreien Proteinbiosynthese lassen sich insbesondere synthetische Proteine, welche unnatürliche Aminosäuren enthalten, herstellen. Hierbei wird das Codon
30 einer Aminosäure durch Mutation in ein Nonsense-Codon entsprechend einem Terminationscodon umgewandelt. Der Einbau unnatürlicher Aminosäuren erfolgt durch zu diesem

Terminationscodon komplementäre tRNAs, welche mit den unnatürlichen Aminosäuren synthetisch beladen sind. Das Terminationscodon UAG steht für das Amber-Codon, entsprechend werden die dem Terminationscodon UAG komplementäre tRNAs
5 als amber-Suppressor-tRNAs bezeichnet. Der Einbau von unnatürlichen Aminosäuren mit Hilfe von Amber-Suppressor-tRNAs am UAG Stop-Codon steht jedoch in direkter Konkurrenz zum Abbruch der Kettenbildung durch den natürlichen Terminationsfaktor 1 (RF1). Unter Umständen ist die
10 Konkurrenz so stark, dass nur ein sehr geringer Teil der Aminoacyl-tRNA für die Proteinsynthese genutzt wird und ein unerwünscht großer Anteil der Kapazität des Translationssystems für die Synthese terminierter Peptide genutzt wird. Folge dieses Konkurrenzverhaltens ist ein schlechter
15 Einbau der unnatürlichen Aminosäure und somit eine niedrige Ausbeute an modifiziertem Protein, verbunden mit einer hohen Anzahl von unerwünschten Nebenprodukten bestehend aus vorzeitig abgebrochenen oder terminierten Proteinketten.

20 In der Literaturstelle Shimizu et al.; Nature Biotech 19 (8): 751 - 755, 1991 ist ein Pure-System beschrieben, in welchem eine Suppressor-tRNA effizient funktioniert, wenn RF 1 weggelassen wird.

25 Aus der Literaturstelle Short et al.; Biochemistry 38: 8808 - 8819, 1999 ist ein Temperatur sensitiver Terminationsfaktor 1 aus E. Coli bekannt, welcher durch mildes Erhitzen des Lysates inaktiviert wird. Die Steigerung der
30 Ausbeute mit unnatürlichen Aminosäuren modifizierter Proteine ist signifikant. Ebenso sind weniger Nebenprodukte bei der Herstellung des Proteins DHFR zu verzeichnen. Nachteilig an diesem Verfahren ist die Erwärmung des

Lysates, durch welche weitere thermosensitive Faktoren des Proteinbiosyntheseapparates zerstört werden.

5 Technisches Problem der Erfindung

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung eines Lysates zur zellfreien Proteinbiosynthese anzugeben, welches einfach ist, wobei
10 das erhaltene Lysat erhöhte Ausbeuten an synthetischem Protein im üblichen zellfreien Proteinbiosynthese-Verfahren erlaubt.

15 Definitionen

Der Begriff "Lysat" umfaßt alle durch Aufschluß eukaryontischer oder prokaryontischer Zellen hergestellte aktiven Zellextrakte.

20

Unter "essentiellen Translationsprodukten" werden Genprodukte verstanden, welche für das Überleben und/oder die Vermehrung einer Zelle zwingend notwendig sind.

25 Unter "synthetischen Proteinen" werden zellfrei hergestellte Proteine verstanden.

"Reduzierte Ausbeute" bezeichnet, dass die Ausbeute eines synthetischen Proteins durch zellfreie Proteinbiosynthese
30 in einem Lysat, welches das essentielle Translationsprodukt enthält, 10% bezogen auf Gewichte, vorzugsweise 20 % bis 80%, besonders bevorzugt über 90%, geringer ist als die Ausbeute des gleichen synthetischen Proteins in einem

Lysat gleicher Art und bei ansonsten gleichen Bedingungen, aus welchem jedoch das essentielle Translationsprodukt abgetrennt wurde.

- 5 Eine "Markersequenz" stellt eine Struktur dar, welche der Identifizierung von Molekülen u.a. Proteinen dient. Eine solche Struktur kann eine kurze Sequenz von Aminosäuren sein, wobei die Anzahl an Aminosäuren bevorzugt kleiner 10, insbesondere zwischen 4 bis 8 ist. Beispielfhaft ist
10 eine solche Struktur ein Tag. Eine Markersequenz kann auch für Enzyme codieren, anhand derer das markierte Molekül identifiziert und auch abgetrennt werden kann.

Eine "Selektionssequenz" codiert für eine Struktur, der
15 unter bestimmten selektiven Bedingungen nur dem Träger dieser Selektionssequenz ein Überleben erlauben. In der Regel handelt es sich um Resistenzgene gegenüber bestimmten Antibiotika. Weitere Selektionssequenzen können aus dem Stoffwechsel der Nukleinsäuren oder der Ami-
20 nosäuren stammen.

Der Begriff der "Lyse" bezeichnet die Auflösung von Zellen durch Zerstörung der Zellwand bzw. Zellmembran entweder unter Mitwirkung lytischer Enzyme oder durch mechanische
25 oder chemische Einwirkung.

Grundzüge der Erfindung

- 30 Zur Lösung des technischen Problems lehrt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Lysates zur zellfreien Proteinbiosynthese mit den folgenden Verfahrensschritten:
a) Austausch einer für ein essentielles, jedoch die

Ausbeute einer zellfreien Proteinbiosynthese reduzierendes Translationsprodukt codierenden genomischen Sequenz in einem Organismus gegen eine unter einem geeigneten regulatorischen Element stehende fremde DNA, wobei die fremde
5 DNA für das essentielle Translationsprodukt, jedoch zusätzlich enthaltend eine Markersequenz codiert, b) Kultivieren des gemäß a) klonierten Organismus, c) Lyse der Organismen aus der Kultur nach b) und d) Abtrennung des essentiellen Translationsproduktes aus dem in c erhaltenen
10 Lysat mittels eines für die Markersequenz selektiven Trennverfahrens. Das regulatorische Element kann ebenfalls fremd sein, es kann sich aber auch um ein natürlicherweise vorliegendes regulatorisches Element handeln. In ersterem Falle muß auch das regulatorische Element, im gleichen
15 Verfahrensschritt, wie die Einführung der fremden DNA oder in einem hiervon verschiedenen Verfahrensschritt, eingeführt werden.

Die Herstellung des erfindungsgemäßen Lysates ist einfach,
20 und das erhaltene Lysat erlaubt erhöhte Ausbeuten an synthetischem Protein in zellfreien Proteinbiosynthese-Verfahren, insbesondere eine hohe Ausbeute an Proteinen mit nicht-natürlichen Aminosäuren.

25 Dies wird dadurch erreicht, dass das essentielle Translationsprodukt mit einer Markersequenz versehen wird, durch welche das essentielle Translationsprodukt über die Affinität der Markersequenz aus dem Lysat entfernt oder seine Aktivität inhibiert wird. Die Modifizierung des es-
30 sentiellen Translationsproduktes erfolgt im chromosomalen Gen des Proteins, so daß das essentielle Translationsprodukt mit der Markersequenz fusioniert exprimiert wird. Eine Markersequenz codiert für eine Struktur, welche eine

hohe Affinität für (meist immobilisierte) Bindungsstellen in Trennsystemen zur Aufreinigung oder zu Inhibitoren aufweist. Dadurch kann die Aktivität des essentiellen Translationsproduktes aus einer Mixtur von Proteinen oder einer
5 Mixtur von beliebigen Molekülen, welche die Markersequenz nicht enthalten, entfernt werden.

Durch den Einbau der Markersequenz in das chromosomale Gen des essentiellen Translationsproduktes des Organismus wird
10 eine stabile Transformation des Organismus erreicht. Unter dieser Voraussetzung ist eine Kultivierung des gentechnisch veränderten Organismus ohne Verlust seiner zusätzlichen genetischen Information möglich, und zwar auch ohne Selektionsdruck.

15

Ein bevorzugtes Merkmal der vorliegenden Erfindung ist, dass die Markersequenz die Proteineigenschaften des essentiellen Translationsproduktes nicht beeinträchtigt. Ein aktives essentielles Translationsprodukt ist vorteilhaft
20 für eine erfolgreiche Kultivierung des genetisch veränderten Organismus. Die Bestimmung der Funktionalität des mit einer Markersequenz versehenen essentiellen Translationsproduktes erfolgt über ein für die Funktion des essentiellen Translationsproduktes spezifisches Assay. Hierzu
25 wird ein DNA-Fragment codierend für das essentielle Translationsprodukt und die Markersequenz über eine Expressions-PCR translatiert. Die Funktionalität wird anhand der Syntheserate des Produktes, an dessen Synthese das essentielle Translationsprodukt beteiligt ist, beurteilt.
30 Die Syntheserate in Gegenwart des nativen essentiellen Translationsproduktes wird mit der Syntheserate in Gegenwart des modifizierten essentiellen Translationsproduktes verglichen und darüber die Funktionalität

beurteilt. Die Funktionalität des essentiellen Translationsproduktes ist durch die Markersequenz nicht beeinträchtigt, wenn die Produktsyntheserate des markierten essentiellen Translationsproduktes 10%, bevorzugt 40 bis 5 60 %, insbesondere über 90% der Syntheserate des nativen essentiellen Translationsproduktes beträgt.

Das Lysat aus einem stabil transformierten erfindungsgemäßen Organismus enthält bis zu 100 Gew.-% (bezogen auf 10 die Gesamtmenge an Translationsprodukt) das essentielle Translationsprodukt in Fusion mit der Markersequenz und ist allenfalls nur geringfügig (< 10 Gew.-%, sogar < 1 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge an Translationsprodukt) mit dem natürlichen essentiellen Translationsprodukt 15 kontaminiert. Durch die Markersequenz ist das im Lysat unerwünschte essentielle Translationsprodukt leicht und effektiv aus dem Lysat entfernbare. Infolgedessen ist die Proteinbiosynthese synthetischer Proteine, in welche nicht-natürliche Aminosäuren eingebaut sind, schneller, 20 mit höheren Ausbeuten und einer geringeren Anzahl von Nebenprodukten durchführbar.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist, dass speziell nur eine unerwünschte Komponente aus dem Lysat entfernt werden 25 kann. Es kann aber auch vorgesehen sein, dass mehrere verschiedene unerwünschte Translationsprodukte mit verschiedenen Markersequenzen, vorteilhafterweise jedoch mit der gleichen versehen sind, so dass mit einer Trennmethode alle unerwünschten Translationsprodukte entfernt werden 30 können. Insofern kann die Verfahrensstufe a) für verschiedene Translationsprodukte ausgeführt werden, wobei die Markersequenz jeweils gleich oder verschieden sein kann.

Ausführungsformen der Erfindung

- 5 Die Klonierung des Organismus kann durch in Fachkreisen bekannte Transformationsmethoden wie Mikroinjektion, Elektroporation oder durch chemisch vermittelte Aufnahmen der DNA erfolgen.
- 10 Die Isolierung des erfolgreich klonierten Organismus erfolgt anhand der Selektionssequenz nach in Fachkreisen bekannten Verfahren.

Die Kultivierung des Organismus kann im Batch-, Fed-Batch
15 oder kontinuierlichen Verfahren erfolgen.

Ebenso kann die Proteinbiosynthese von synthetischen Proteinen enthaltend nicht-natürliche Aminosäuren im Batch-, Fed-Batch oder kontinuierlichen Verfahren erfolgen.

20

Die Lyse der Zellen erfolgt beispielsweise durch mechanische Einwirkung wie Hochdruckhomogenisation, durch Ultraschall oder durch Aufschluss in Kugelmøhlen.

- 25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das essentielle Translationsprodukt der Terminationsfaktor RF1, welcher das Terminationscodon UAG erkennt. Es versteht sich, dass das essentielle Translationsprodukt auch aus anderen Proteinen, die die Funktion eines Lysates zur
30 zellfreien Proteinbiosynthese herabsetzen oder stören, ausgewählt werden kann. Beispielsweise kann das essentielle Translationsprodukt ein anderer Terminationsfaktor sein oder ein Protein, das mit einem Terminationsfaktor

interagiert, beispielsweise HemK. Auch andere Faktoren der Translation, deren Inaktivierung für die lebende Zelle letal wäre, deren Entfernung aber die Effizienz der Translation oder andere Anwendungen des Lysates positiv beeinflusst, können im Rahmen der Erfindung aus Lysaten entfernt werden. So kann das essentielle Translationsprodukt beispielsweise eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase umfassen, deren Entfernung zu einer Inaktivierung der entsprechenden durch die Synthetase erkannten tRNAs führen würde, so dass

5 flußt, können im Rahmen der Erfindung aus Lysaten entfernt werden. So kann das essentielle Translationsprodukt beispielsweise eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase umfassen, deren Entfernung zu einer Inaktivierung der entsprechenden durch die Synthetase erkannten tRNAs führen würde, so dass

10 letztendlich eine bestimmte Aminosäure an ausgewählten Codons durch eine andere ersetzt werden kann. Bevorzugt ist in diesem Zusammenhang beispielsweise die Cysteinyl-tRNA-Synthetase, durch deren Entfernung aus dem Lysat die beiden Codone für Cystein für andere - insbesondere auch

15 unnatürliche oder modifizierte - Aminosäuren zur Verfügung stehen würden. Prinzipiell sind alle Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, besonders diejenigen, welche relativ selten in Proteinen enthaltene Aminosäuren aktivieren, denkbar. Ein anderes essentielles Translationsprodukt besteht in

20 der Methionyl-tRNA Transformylase, die die Formylierung der prokaryontischen Methionyl-Initiator-tRNA (Met-tRNA^f) katalysiert. Die Entfernung dieses Enzyms - oder auch eines anderen Enzyms des Formylierungsweges - aus einem System für die zellfreie Proteinbiosynthese würde die

25 Translationsinitiation mit natürlichem Methionin wesentlich reduzieren oder sogar vollständig ausschalten. Hierdurch könnte die Effizienz von Initiator-tRNAs, die mit N-formylierten modifizierten oder unnatürlichen Aminosäuren, beispielsweise fluoreszierenden oder

30 biotinylierten Aminosäuren, präacyliert wurden, wesentlich erhöht werden, und somit die Synthese kotranslational N-terminal modifizierter Proteine beträchtlich gesteigert werden. Auch der Markierungsgrad solcherart modifizierter

Proteine könnte wesentlich, wahrscheinlich bis nahe 100% erhöht werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, einen Initiationsfaktor dem System zu entnehmen, um gezielt in die Initiation eingreifen zu können. Beispielsweise könnte dieser Faktor dann zusammen mit präacylierter tRNA wieder in das System gegeben werden oder durch einen anderen Initiationsfaktor ersetzt werden. Andere Beispiele für essentielle Translationsprodukte können aus der Gruppe der Phosphatasen ausgewählt werden und beispielsweise den Energiehaushalt der Lysate positiv beeinflussen. Die Manipulation von Enzymen des Aminosäurestoffwechsels, beispielsweise die Entfernung von Amino-transferasen oder Isomerasen, ist dazu geeignet, die Einführung einzelner markierter Aminosäurespezies ohne Scrambling zu ermöglichen. Selbstverständlich können essentielle Translationsprodukte auch aus der Gruppe eukaryontischer Proteine ausgewählt werden. Hier sind beispielsweise Faktoren der eukaryontischen Translationsinitiation zu nennen, wie eIF2. Dieser Faktor besitzt eine regulatorische Untereinheit, eIF2 α , die in ihrer phosphorylierten Form die Initiation der Translation inhibiert. Da eIF2 auch ohne diese Untereinheit aktiv ist, wurde die Entfernung von eIF2 α zu einer Verbesserung der Translationsinitiation und somit zu einer Verbesserung der Proteinausbeuten im eukaryontischen zellfreien System führen. Auch Faktoren aus der Gruppe der Nukleasen, Proteasen, Kinasen, Racemasen, Isomerasen, Dehydrogenasen oder Polymerasen können bevorzugte Ziele des prokaryontischen oder eukaryontischen Systems sei.

30

In einer besonderen Ausführungsform ist die Markersequenz ausgewählt aus der Gruppe "StrepTag-II, Polyhistidin, FLAG, Polyarginin, Polyaspartat, Polygluthamin,

Polyphenylalanin, Polycystein, Myc, Gluthadion-S-Transferase, Protein A, Maltose bindendes Protein, Galactose bindendes Protein, Chloramphenicol-Acetyltransferase". Weitere Beispiele sind in den Patentansprüchen angegeben.

Die Markersequenz und das chromosomale Gen des essentiellen Translationsproduktes werden als Fusionsprotein exprimiert. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die
10 Markersequenz ein StrepTag-II, eine Peptidstruktur aus 8 Aminosäuren mit Affinität zu StrepTactin. So kann beispielsweise der exprimierte Terminationsfaktor RF1 am c-terminalen Ende das StrepTag-II aufweisen. Die Abtrennung des RF1-StrepTagII-Fusionsproteins erfolgt entsprechend an einer mit StrepTactin beladenen
15 Affinitätsmatrix oder anderen SII-bindenden Matrices. Die Abtrennung kann auf der Basis säulenchromatographischer Verfahren, aber auch über Batchverfahren erfolgen. Es versteht sich, dass auch eine andere Markersequenz und ihr
20 entsprechender Affinitätspartner anwendbar ist. Beispielsweise sei hier das PolyHis-Tag genannt. Ein PolyHis-Tag besteht in der Regel aus sechs aufeinanderfolgenden Histindinresten, kann in seiner Länge aber zwischen 4 bis 10 Resten variieren. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Isolierung der essentiellen
25 Translationsprodukte über entsprechende Antikörper, Antikörperfragmente oder über Aptamere. Unter Umständen bewirkt die Affinität der Bindungspartner auch gleichzeitig eine Inhibition der Aktivität des essentiellen Transla-
30 tionsproduktes.

Hinsichtlich der Wahl der Methode zur Proteinabtrennung ist eine Methode auszuwählen, welche die

Translationsaktivität des Lysates nicht negativ beeinflusst, d.h. wichtige Reaktionskomponenten des Translationssystems nicht abgetrennt.

5 Grundsätzlich kann der Organismus eine Eukaryont oder Prokaryont sein. Vielfach hilfreich ist, wenn der Organismus zur Herstellung eines Lysates ein Prokaryont ist. Ergänzend wird auf die Patenansprüche verwiesen. Besonders geeignet ist das Translationssystem aus *Escherichia coli*.

10

Die Erfindung lehrt desweiteren ein Lysat zur zellfreien Proteinbiosynthese mit einer verminderten Aktivität eines essentiellen Translationsproduktes sowie dessen Verwendung zur Herstellung synthetischer Proteine enthaltend nicht-
15 natürliche oder modifizierte natürliche Aminosäuren. In einer bevorzugten Ausführungsform weist das Lysat eine verminderte Aktivität eines an der Termination beteiligten Faktors, bevorzugt RF1, auf. Ein Beispiel für die Herstellung modifizierter synthetischer Proteine ist der Einbau
20 von Biotinyllysine (Biocytin) mittels einer mit der Aminosäure aminoacylierten *amber*-Suppressor-tRNA. Bezüglich der Synthese und Aufreinigung biotinylierter oder anderer StrepTactin-bindender Proteine weist das System einen weiteren Vorteil auf: Da endogene biotinylierte Proteine
25 während der Abtrennung von RF1-II ebenfalls abgetrennt werden, wird eine Kontamination von synthetischen Proteinen, die mit Hilfe von Streptavidin oder ähnlichen Matri- ces aufgereinigt werden, mit biotinylierten Proteinen aus dem Produktionsstamm vermieden. Das Lysat ermöglicht aber
30 auch den effizienteren Einbau anderer funktioneller Gruppen in Proteine, besonders bevorzugt den Einbau von Fluorophoren, - oder den einer universell reaktiven Gruppe, über die andere Funktionen selektiv und

ortsspezifisch gekoppelt werden können. Eine Verwendungsalternative ist auch der Einbau von natürlichen Aminosäuren, die beispielsweise isotopenmarkiert oder selenhaltig vorliegen können.

5

Die Beladung der *amber*-Suppressor-tRNA mit der unnatürlichen Aminosäure kann mittels der sogenannten chemischen Aminoacylierung erfolgen oder auch mit Hilfe von Enzymen, beispielsweise Synthetasen oder Ribozyme. Es ist auch
10 möglich, enzymatische und verschiedene chemische Methoden miteinander zu kombinieren. Beispielsweise kann die tRNA erst chemisch oder enzymatisch mit Lysin, Cystein oder einer anderen Aminosäure, die eine reaktive Funktion in der Seitenkette enthält, aminoacyliert werden. An die ent-
15 sprechende Aminoacyl-tRNA wird dann über die reaktive Funktion der Aminosäure eine interessante funktionelle Gruppe, beispielsweise ein Fluorophor, mit Hilfe gebräuchlicher chemischer Methoden gekoppelt. So kann beispielsweise die Sulfhydrylgruppe von Cystein über Maleimid
20 modifiziert werden oder eine Aminogruppe über einen NHS-Ester. Die Aminoacylbindung der tRNA kann während der Modifikation stabilisiert sein, beispielsweise durch das Vorhandensein einer Schutzgruppe an der alpha-Aminogruppe.

25 Das System eignet sich für die Beantwortung und Lösung wissenschaftlicher Fragestellungen der Proteinforschung. Weiterhin eignet sich das System prinzipiell für ein Ribosomen-Display, da nach der Entfernung eines Terminationsfaktors das entsprechende Codon nicht abgelesen werden
30 kann und dadurch der ribosomale Komplex aus mRNA, synthetischem Protein und Ribosom eine erhöhte Stabilität aufweist. Das System erlaubt auch eine definierte Einführung von Puromycin oder entsprechender Derivate an der

Position des oben genannten Codons. Puromycin konkurriert normalerweise mit dem ternären Komplex oder Terminationsfaktoren und wird statistisch an das Ende der wachsenden Proteinkette angefügt. Die Generierung eines "ausgehunger-

5 ten" Codons durch die Entfernung eines Terminationsfaktors ermöglicht den definierten Einbau von Puromycin an dieser Position. Auf diese Weise können an synthetische Proteine Funktionen angehängt werden, die an das Puromycin gekoppelt werden, beispielsweise DNA-Oligomere, Zucker oder

10 andere Bausteine.

In einer anderen Ausführungsform kann das Lysat auch eine verminderte Aktivität eines anderen essentiellen Translationsproduktes aufweisen, beispielsweise eines aus der

15 Gruppe der Phosphatasen, der Nukleasen, der Synthetasen oder Proteasen. Hierdurch kann die Herstellung solcher synthetischer Proteine verbessert werden, deren Synthese durch die Aktivität anderer essentieller Translationsprodukte als durch die Aktivität der Terminationsfaktoren

20 limitiert wird.

Es ist auch möglich, mit Hilfe der dargelegten Methode bestimmte essentielle Translationsprodukte aus dem Lysat zu entfernen, die eine Beantwortung bestimmter wissenschaftlicher Fragestellungen stören, oder deren Entfernung eine Untersuchung bestimmter Fragestellungen erst ermöglicht.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von nicht limitierenden Beispielen näher erläutert.

30

Beispiel 1: Konkurrenzverhalten von RF1 und
amber-Suppressor-tRNA

In der Figur 1 ist eine schematische Darstellung des
5 Konkurrenzverhaltens von RF1 und einer amber-Suppressor-
tRNA dargestellt. Je nachdem welches der beiden Moleküle
mit dem Codon UAG paart, wird das Protein terminiert oder
eine Aminosäure eingebaut und die Translation mit der
Bildung des Suppressionsproduktes fortgeführt.

10

Beispiel 2: Voruntersuchungen zur Funktionalität von
RF1-SII: Expressions-PCR

15 Da eine Inaktivierung des Terminationsfaktors RF1 lethal
für den Organismus wäre, wurde der Einfluß des angefügten
StrepTags II auf die Aktivität von RF1 untersucht. Für
diese Untersuchung wurde RF1 ausschließlich von
Expressions-PCR-Produkten translatiert. Figur 2 zeigt die
20 präparative Expression und Aufreinigung von RF1-SII. R
entspricht der in vitro Translationsreaktion, D dem Durch-
lauf, W1, W2, W3 den Waschfraktionen und E1, E2, E3 den
Elutionsfraktionen.

25 Beispiel 3: Voruntersuchungen zur Funktionalität von
RF1-SII: Amber-Suppressor-Assay

Figur 3 zeigt den Funktionstest von RF1-SII im amber-
Suppressor-Assay. Die Ziffern 1 in Figur 3A bezeichnet die
30 Durchführung des Assays in einem Ansatz ohne Zugabe von
Suppressor-tRNA. Die Ziffern 2 bis 5 sind Ansätze mit
Suppressor-tRNA (1 µM). Ansatz 2 enthält kein RF1-SII. Die
Ansätze 3 bis 5 sind mit aufgereinigtem RF1-SII (3: 0,0625

µM, 4: 0,13 µM, 5: 0,26 µM) angereichert. Figur B zeigt die Rate der tRNA-Selektion in Abhängigkeit von der Zugabe von RF1-SII. Die "Rate der tRNA-Selektion" wird berechnet, indem anhand eines PhosphoImage die molaren Mengen an synthetischem Suppressions- und synthetischem Terminationssprodukt bestimmt werden und der Quotient aus den beiden Werten gebildet wird. Die Erhöhung des RF1-SII-Anteils im Ansatz führt zu einer vermehrten Produktion des Terminationsproduktes. Figur 3B zeigt die Rate der tRNA-Selektion in Abhängigkeit von der Mengen RF1-SII im Ansatz. Die tRNA-Selektionsrate sinkt mit der Zugabe von RF1-SII von 3,5 auf unter 1 ab und kann durch Erhöhung des RF1-SII-Anteils weiter reduziert werden. Dies bestätigt, dass RF1-SII prinzipiell aktiv ist.

15

Beispiel 4: Voruntersuchungen zur Funktionalität von
RF1-SII: Aktivitätsvergleich mit nativem RF1

Figur 4 stellt den Vergleich der Funktionalität und Aktivität von getaggttem und nativem RF1 im Amber-Suppressions-Assay dar. RF1-SII zeigt gegenüber RF1 eine vergleichbare Aktivität. Figur 4B zeigt für RF1-SII in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an Matrize gegenüber RF1 eine geringere Syntheserate. Unter Berücksichtigung der Syntheseraten von RF1-SII und nativem RF1 wurden dann die Raten der tRNA-Selektion in Gegenwart beider Proteine bei der Expression des Reporterproteins FABPAmb88 aus dem PhosphoImage (Fig. 4A) bestimmt. Die für das Reporterprotein kodierende Matrize (pHMFPAmb88) enthält eine *amber*-Mutation an Aminosäureposition 88. Die Rate der tRNA-Selektion in Gegenwart von RF1-SII ist nahezu identisch

mit der in Gegenwart von nativem RF1 (Diagramm 4C). Beide Proteine weisen somit eine vergleichbare Aktivität auf.

5

Beispiel 5: Simulation der Entfernung von RF1-SII aus Lysaten

Zur Simulation der Entfernung von RF1-SII aus Lysaten
10 wurde RF1-SII präparativ hergestellt und mit ^{14}C -Leucin (100 dpm/pmol) markiert. Im Anschluß daran wurde das synthetisierte, aufgereinigte RF-SII einem S30-Lysat in einer Endkonzentration von 0,1 μM (in 1x TLM-Puffer, 215 A_{260}/ml) zugegeben. Die Abtrennung des RF1-SII erfolgt über
15 eine StrepTactin-Säule, wobei insgesamt 500 μl Lysat (= ca. 110 A_{260}) auf 200 μl Säule in drei Schritten à 166 μl aufgetragen wurden. Das Waschvolumen betrug je 200 μl . In Figur 5 ist das Elutionsverhalten von Lysatkomponenten und speziell von RF1-SII mit und ohne Zugabe von NaCl sowie
20 der jeweilige Anteil von RF1-SII im Lysat dargestellt. Figur 5A zeigt das Elutionsverhalten von Lysatkomponenten. Aus Figur 5A ist zu entnehmen, dass die Lysatkomponenten größtenteils nicht oder nur unspezifisch an der Säule gebunden wurden. Unspezifisch gebundene Lysatkomponenten
25 wurden durch Waschen leicht wieder eluiert (Waschfraktionen). Das verwendete Verfahren mindert somit nicht die Aktivität des Lysates durch Abtrennung erwünschter Lysatkomponenten. In Figur 5B ist das Elutionsverhalten von RF1-SII dargestellt und offenbart, dass RF1-SII spezi-
30 fisch an der StrepTactin-Säule bindet und erst durch die Elutionslösung von der Säule eluiert wird (Elutionsfraktion, Figur 5B). In den Fraktionen des Durchlaufs sowie

des Waschen ist RF1 nur geringfügig enthalten. Die Figuren C1 und C2 zeigen den Anteil von RF1-SII im Lysat in Abhängigkeit vom jeweiligen Abtrennungsschritt. Figur C1 enthält die Werte dpm RF1/ml im Verhältnis zu OD260/ml des Lysates. Der Anteil von RF1-SII (dpm/OD260) im reinen Lysat in Figur 5C1 ist in Figur 5C2 gleich 100% gesetzt, sodass Figur 5C2 den prozentualen Anteil von RF1-SII im Lysat darstellt. Figur 5C2 zeigt, dass RF1-SII nach den Abtrennungsschritten "Durchlauf" und Waschfraktion" in deutlich geringem Anteil im Lysat enthalten ist.

Beispiel 6: genomische Struktur eines genetisch veränderten Organismus

15

In der Figur 6 ist eine schematische Darstellung des chromosomalen Gens eines erfindungsgemäß ausgetauschten Proteins vor und nach der Klonierung dargestellt. Man erkennt die ursprüngliche genomische Situation (Figur 6B), welche aus dem RF1-Gen, einem Regulationselement und dem Gen für HemK besteht und die gewünschte genetische Situation (Figur 6A), in welcher an das Gen von RF1 die Markersequenz von StrepTag-II angehängt ist. Desweiteren enthält die gewünschte genetische Situation eine Selektionssequenz, hier eine Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin sowie neue regulatorische Elemente. Ein erfindungsgemäßer Organismus ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH gemäß dem Budapester Vertrag hinterlegt unter der Nummer DSM 30 15756 (E. coli/RF1-SII).

Beispiel 7: Herstellung eines an RF1 defizienten Lysates

Die Kultivierung dreier E. coli /RF1-SII Klone (a,b,d) wurde in Schüttelkulturen vorgenommen. Die Kulturen wurden in der log-Phase geerntet und mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen. Das RF1-SII haltige Lysat wurde in zwei Ansätze geteilt und RF1-SII durch unterschiedliche Methoden abgetrennt. Aus Ansatz A (in Figur 5 entsprechend Index A) wurde RF1-SII durch Affinitätschromatographie an einer StrepTactin-Säule (500 µl Lysat (= ca. 110 A₂₆₀) auf 200 µl Säule) abgetrennt. Der Ansatz B (in Figur 7 entsprechend Index B) wurde einer Präinkubation (400 mM NaCl) unterworfen und im Anschluß daran RF1-SII über eine StrepTag-Säule (500 µl Lysat (= ca. 125 A₂₆₀) auf 200 µl Säule) abgetrennt. Hiernach erfolgte Entsalzung über NAP 5. Die Ergebnisse sind der Figur 7 A und B zu entnehmen, welche den Nachweis von RF1-SII mittels SDS-Page und Westernblot im Elutionsvolumen zeigt. Figur 7A zeigt die Coomassieblaufärbung des Geles. Figur 7B zeigt die Detektion von RF1-SII mit Streptavidin-HRP oder Anti-SII (monoklonale Antikörper gegen StrepTag). Als Standard dient in vitro translatiertes und aufgereinigtes RF1-SII. LMW6 ist ein Molekulargewichtsmarker, K_A ein Lysat aus einem gentisch unveränderten E. Coli-Stamm, welches der Abtrennungsmethode des Ansatzes A unterworfen wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass RF1-SII durch beide Methoden aus dem Lysat erfolgreich abgetrennt wurde.

Beispiel 8: Expression von RF1-SII

Es wurden zwei E. coli-Stämme mit dem unter Beispiel 6 angegebenen synthetischen DNA-Fragment (gewünschte

genetische Situation) geklont. Mit Hilfe der Expressions-PCR wurden die Proteine RF1 und HemK aus der chromosomalen DNA (E. Coli K12) amplifiziert, kloniert und sequenziert. Über die PCR wurde auch die StrepTag-Sequenz (SII) an das 5 Gen für RF1 angefügt sowie die neuen Regulationselemente für die Expression von HemK eingefügt. Beide Proteine wurden zellfrei translatiert, um ihre Exprimierbarkeit sowie im Falle von RF1 auch ihre Funktionalität zu überprüfen. Hierauf begann die Herstellung der Genkassette mit der 10 gewünschten genomischen Situation für den chromosomalen Austausch. Es wurden drei PCR-Fragmente (mit den Genen für RF1-SII, für die Kanamycin-Resistenz sowie für HemK) hergestellt und miteinander ligiert. Die Ligation erfolgt unter Verwendung asymmetrischer Restriktionsschnittstellen 15 in einer Eintopfreaktion, d.h. die drei Fragmente wurden in einem Schritt miteinander ligiert. Das entstehende DNA-Fragment mit der gewünschten genomischen Situation wurde geleluert, in einen Vektor kloniert, sequenziert und mit Hilfe der PCR amplifiziert. Hierauf erfolgte die Transfor- 20 mation des PCR-generierten linearen Fragments in E. coli D10 mit Hilfe der Elektroporation. Die Kanamycin-Resistenz wurde für die Selektion auf Klone mit der gewünschten genomischen Situation verwendet. Hierzu wurden die Zellen auf Kanamycin-Platten ausgestrichen. Die vier positiven 25 Klone wurden einer Gegenselektion in ampicillinhaltigem Medium unterzogen, um ausschließen zu können, dass das für die Amplifikation des Genfragmentes verwendete Plasmid, das eine Ampicillin-Resistenz trägt, transformiert wurde. Weiterhin wurde mit Hilfe der Kolonie-PCR das Vorhanden- 30 sein des gewünschten Genfragmentes innerhalb des E. Coli-Chromosoms überprüft. Hierzu wurde ein Primer, der innerhalb der Kassette hybridisiert, mit einem Primer kombiniert, der im E. coli-Chromosom außerhalb der

transformierten Kasette hybridisiert. Alle vier positiven Klone wiesen die gewünschte genomische Situation auf. Figur 8 zeigt die in vivo Expression von RF1-SII im Westernblot. Die Abtrennung von RF1-SII erfolgte über eine StrepTactin-Säule. Der Nachweis des Proteins wurde mit Anti-SII (monoklonaler Antikörper gegen StrepTag) durchgeführt. Die Figur 8 zeigt eine deutliche Expression von RF1-SII in den beiden Klonen a und b. Die Negativkontrolle "0" aus einem genetisch unverändertem Stamm zeigt keine Expression von RF1-SII. Die Probe "K" ist in vitro translatiertes RF1-SII und dient als Marker und Positivkontrolle.

Beispiel 9: Einfluß der RF1-Abtrennung auf die Effizienz der Suppression im regenerierbaren System.

Die Figur 9 stellt das Ergebnis der in vitro Proteinbiosynthese mit einem erfindungsgemäßen Lysat und einem RF1 haltigen Lysat dar. Figur 9A zeigt das PhoshoImage eines SDS-Gels, welches die jeweiligen Anteile des Terminationsproduktes und des Suppressionsproduktes vor und nach der Abtrennung von RF1 in Abhängigkeit von der Menge an Suppressor-tRNA zeigt. In diesem Fall wurde eine enzymatisch aminoacylierbare tRNA verwendet. Bei einem Suppressor-tRNA-Anteil von 1,2 μM im RF1-defizienten Lysat sind nur noch geringe Mengen des Terminationsproduktes detektierbar. Durch Abtrennung von RF1 wird die Translation des Suppressionsproduktes erhöht (Figur 9B) und gleichzeitig das Verhältnis Suppressionsprodukt/Terminationsprodukt auf die Seite des Suppressionsproduktes verschoben (Figur 9C). Zudem wird die Syntheserate des Suppressionsproduktes durch höhere Zugabemengen der

Suppressor-tRNA gesteigert. Im Ergebnis wird durch Abtrennung von RF1 aus einem Lysat die Syntheserate eines Suppressionsproduktes deutlich erhöht und somit die Ausbeute gesteigert.

5

Beispiel 10: Einbau einer nicht-natürlichen Aminosäure

Die Figur 10 zeigt beispielhaft den gesteigerten Einbau von Biotinyllysin in Abwesenheit von RF1 in FABP (Figur 10A, PhosphoImage). Es wurde eine amber-Suppressor tRNA verwendet, die über chemische Methoden mit Biotinyllysin (Biocytin) beladen wurde. Die Markierung der translatierten Proteine mit ^{14}C -Leucin bestätigt die höhere Syntheserate an biotinyliertem FABP in einem RF1-defizienten Lysat (Figur 10B und C).

Beispiel 11: Einbau von Biocytin mit Hilfe einer mit chemischen Methoden beladenen amber-Suppressor-tRNA - Nachweis biotinylierter Proteine im Westernblot

Fig. 11A zeigt den Westernblot, 11B die Quantifizierung des Westernblots über die Detektion von Chemilumineszenz. Es wurde ein monoklonaler Antikörper gegen StrepTag II verwendet, der mit HRP gekoppelt war. Der Westernblot zeigt eindeutig die stark erhöhte Synthese an synthetischem biotinyliertem Protein im Lysat nach RF1-Abtrennung. Weiterhin zeigt der Blot, daß durch die verwendete Methode zur Herstellung des RF1-defizienten Lysat auch endogene biotinylierte Proteine entfernt werden: Das in Lysaten aus *E. coli* relativ hochkonzentrierte

endogene Protein BCCP wird nach RF1-Abtrennung kaum noch detektiert. Die Quantifizierung des Westernblots zeigt noch einmal die stark erhöhte Synthese an synthetischem modifiziertem Protein im RF1-defizienten Lysat und
5 bestätigt die über Radioaktivität durchgeführte Quantifizierung aus Beispiel 10.

Beispiel 12: Einbau von Biocytin in Abhängigkeit von der
10 Reaktionszeit

Mit längerer Reaktionszeit wird, wie Figur 12 zeigt, vermehrt Biotinyllysin (Biocytin) eingebaut. Infolgedessen erhöht sich der Anteil an Suppressionsprodukt an der Gesamtproduktmenge. Durch längere Reaktionszeiten wird die
15 Ausbeute des biotinylierten Suppressionsproduktes gesteigert.


20

25

30

RiNA GmbH
Takustraße 3
14195 Berlin

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: RF1-SII	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 15756
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: (<input checked="" type="checkbox"/>) a scientific description (<input checked="" type="checkbox"/>) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2003-07-15 . (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2003-07-16

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

RiNA GmbH
Takustraße 3
14195 Berlin


EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: RF1-SII	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 15756
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>(X) eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2003-07-15 (Datum der Erst- hinterlegung)¹ eingegangen ist.</p>	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am _____ eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am _____ eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name. DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift. Maschenoder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Wilko</i></p> <p>Datum. 2003-07-16</p>

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

RiNA GmbH
Takustraße 3
14195 Berlin


LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: RiNA GmbH Takustraße 3 Anschrift: 14195 Berlin	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 15756 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2003-07-15
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2003-07-15 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ⁴	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2003-07-16

Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
 In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
 Zutreffendes ankreuzen.
 Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

RiNA GmbH
Takustraße 3
14195 Berlin

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: RiNA GmbH Takustraße 3 Address: 14195 Berlin		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 15756 Date of the deposit or the transfer: 2003-07-15	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2003-07-15 On that date, the said microorganism was <input checked="" type="checkbox"/> viable <input type="checkbox"/> no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ¹			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 2003-07-16	

- ¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Patentansprüche:

- 1) Verfahren zur Herstellung eines Lysates zur zellfreien
5 Proteinbiosynthese mit den folgenden
Verfahrensschritten:
 - a) Austausch einer für ein essentielles, jedoch die
Ausbeute einer zellfreien Proteinbiosynthese reduzierendes
10 Translationsprodukt codierenden genomischen Sequenz in einem Organismus gegen eine
unter einem geeigneten regulatorischen Element stehende fremde DNA, wobei die fremde DNA für das essentielle
Translationsprodukt, jedoch zusätzlich
15 enthaltend eine Markersequenz codiert,
 - b) Kultivieren des gemäß a) transformierten Organismus,
 - 20 c) Lyse der Organismen aus der Kultur nach b) und
 - d) Abtrennung des essentiellen Translationsproduktes
aus dem in c) erhaltenen Lysat mittels eines für
die Markersequenz selektiven Trennverfahrens.
25
- 2) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass
das essentielle Translationsprodukt ausgewählt ist aus
der Gruppe bestehend aus "Terminationsfaktoren oder mit
30 Terminationsfaktoren interagierende Proteine - insbesondere RF1, RF2, RF3, eRF, L11 oder HemK -,
Initiationsfaktoren oder mit Initiationsfaktoren interagierende Proteine, Elongationsfaktoren oder mit

- Elongationsfaktoren interagierende Proteine,
Aminoacyl-tRNA-Synthetasen - insbesondere Cysteinyl-
tRNA- oder Tryptophanyl-tRNA-Synthetase -, Enzyme des
Aminosäurestoffwechsels - insbesondere Aminotransfera-
5 sen, Isomerasen, Synthetasen -, Phosphatasen, Nuk-
leasen, Proteasen, Kinasen, Racemasen, Isomerasen,
Polymerasen und Kombinationen vorstehender Substanzen".
- 10 3) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch
gekennzeichnet, dass die Markersequenz ausgewählt ist
aus der Gruppe "StrepTag-II, Polyhistidin, FLAG,
Polyarginin, Polyaspartat, Polyglutamin, Polyphenyla-
lanin, Polycystein, Myc, Gluthadion-S-Transferase, Pro-
15 tein A, Maltose bindendes Protein, Galactose bindendes
Protein, Chloramphenicol-Acetyltransferase, Protein G,
Calmodulin, Calmodulin-bindendes Peptid, HAT (= natural
histidine affinity tag), SBP (= Streptavidin-bindendes
Peptid), Chitin-bindende Domäne, Thioredoxin, β -
20 Galaktosidase, S-Peptid (Reste 1-20 der RNase A),
Avidin, Streptavidin, StrepTag-I, Dihydrofolat-
Reduktase, lac-Repressor, Cyclomaltodextrin-
Glucanotransferase, Cellulose-bindende Domäne, Btag,
NanoTag".
- 25
- 4) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die
Markersequenz und das chromosomale Gen als Fusionspro-
tein exprimiert werden und wobei die translatierte
30 Markersequenz die Aktivität des essentiellen Transla-
tionsproduktes im Organismus nicht beeinträchtigt.

- 5) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Trennverfahren eine Affinitätschromatographie oder ein Antikörper-Assay ist.

5

- 6) Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Organismus ein Prokaryont oder Eukaryont ist, insbesondere ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus "Enterobacteriales (z.B. *Escherichia* spec.,
10 *E.coli*), Lactobacillales (z.B. *Lactococcus* spec.,
Streptococcus spec.), Actinomycetales (z.B. *Streptomyces* spec., *Corynebacterium* spec.), *Pseudomonas* spec.,
Caulobacter spec., *Clostridium* spec., *Bacillus* spec.,
15 *Thermotoga* spec., *Micrococcus* spec., *Thermus* spec."

15

- 7) Lysat zur zellfreien Proteinbiosynthese erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei
20 das Lysat eine verminderte Aktivität eines essentiellen Translationsproduktes aufweist.

- 8) Lysat zur zellfreien Proteinbiosynthese nach Anspruch
25 7, wobei das Lysat eine verminderte Aktivität eines oder mehrerer der essentiellen Translationsprodukte ausgewählt aus der Gruppe "Terminationsfaktoren oder mit Terminationsfaktoren interagierende Proteine - insbesondere RF1, RF2, RF3, eRF, L11 oder HemK -,
Initiationsfaktoren oder mit Initiationsfaktoren interagierende Proteine, Elongationsfaktoren oder mit Elon-
30 gationsfaktoren interagierende Proteine, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen - insbesondere Cysteinyl-tRNA- oder Tryptophanyl-tRNA-Synthetase -, Enzyme des

Aminosäurestoffwechsels - insbesondere Aminotransferasen, Isomerasen, Synthetasen -, Phosphatasen, Nukleasen, Proteasen, Kinasen, Racemasen, Isomerasen, Polymerasen und Kombinationen vorstehender Substanzen" aufweist.

9) Verwendung eines Lysates nach Anspruch 7 oder 8 zur zellfreien Proteinbiosynthese.

10) Verwendung nach Anspruch 9, wobei mittels amber-Suppressor-tRNAs natürliche und/oder nicht-natürliche Aminosäuren, bevorzugt Biotinyllysin, fluoreszierende Aminosäuren und/oder Phenylalanin, eingebaut werden.

11) Isolierter Mikroorganismus oder isolierte Zelle, wobei eine für ein essentielles, jedoch die Ausbeute einer zellfreien Proteinbiosynthese reduzierendes Translationsprodukt codierende genomische Sequenz gegen eine unter einem geeigneten regulatorischen Element stehende fremde DNA ausgetauscht ist, wobei die fremde DNA für das essentielle Translationsprodukt, jedoch zusätzlich enthaltend eine Markersequenz codiert.

12) Mikroorganismus, wie hinterlegt unter DSM 15756.

Fig. 1

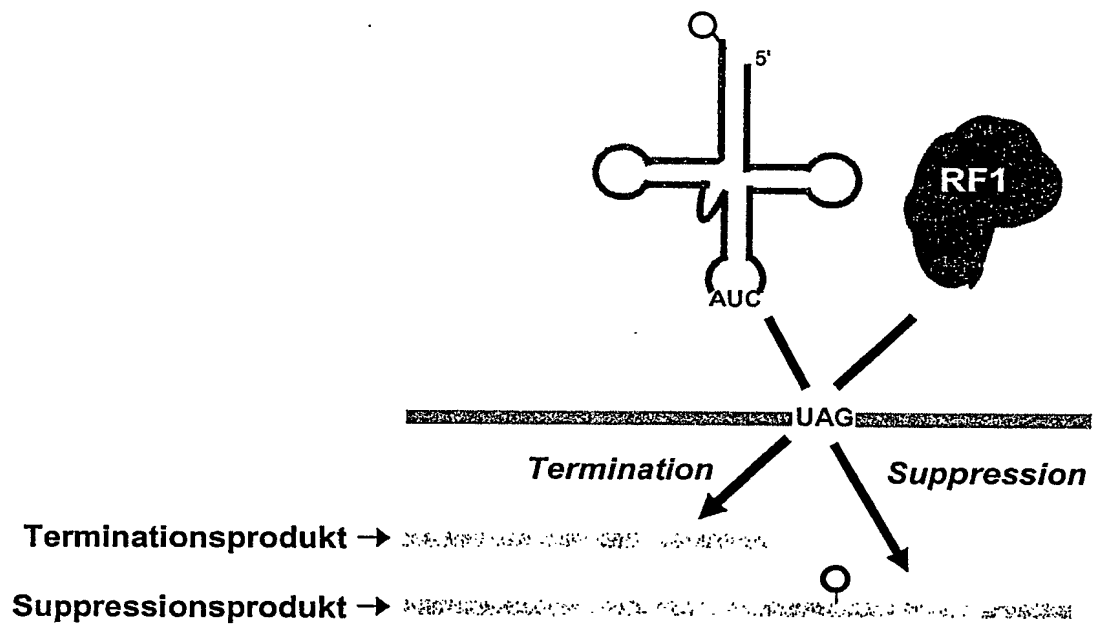


Fig. 2

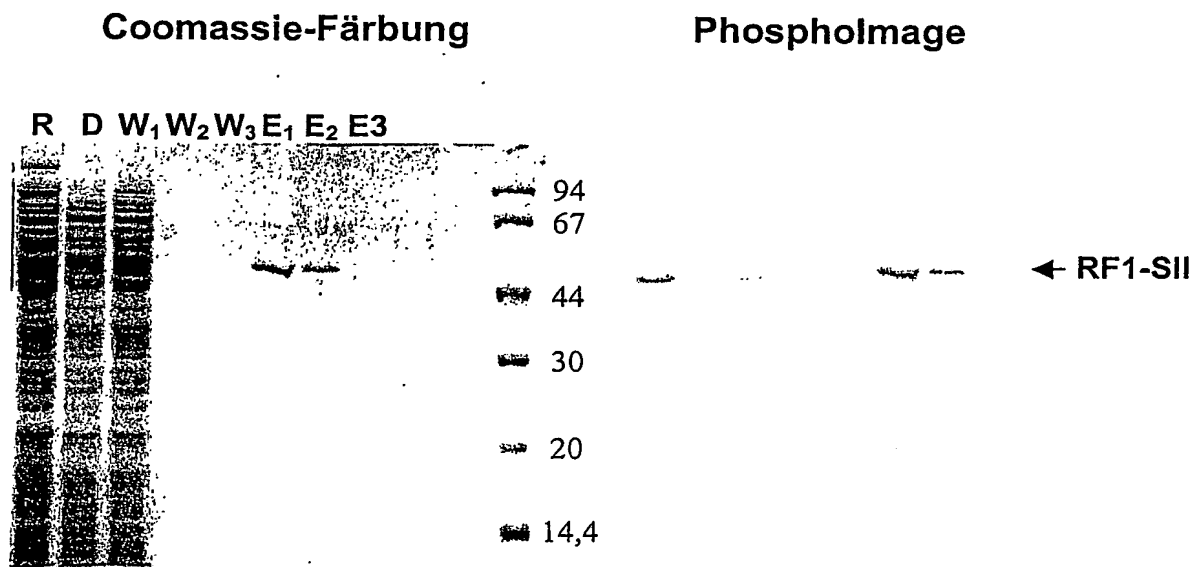


Fig. 3**A** (Phospholmage)

1 2 3 4 5

← RF1-SII

← Sup ("full length" FABP)
← Term

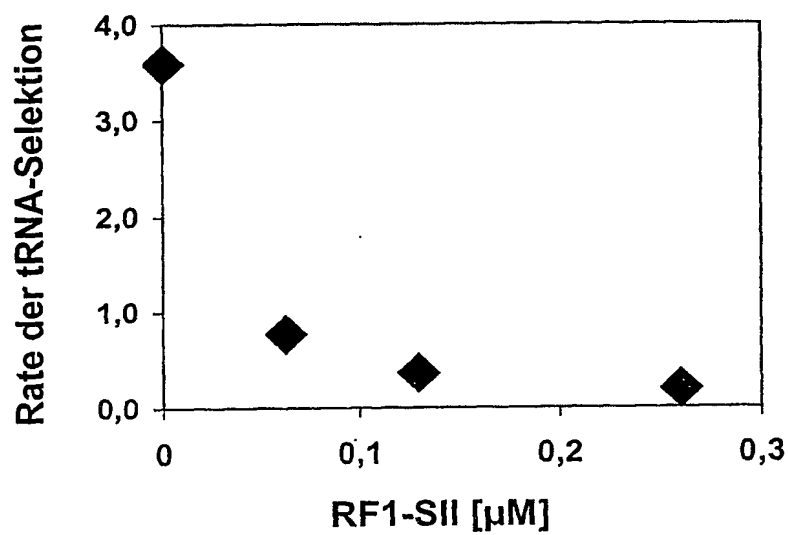
B

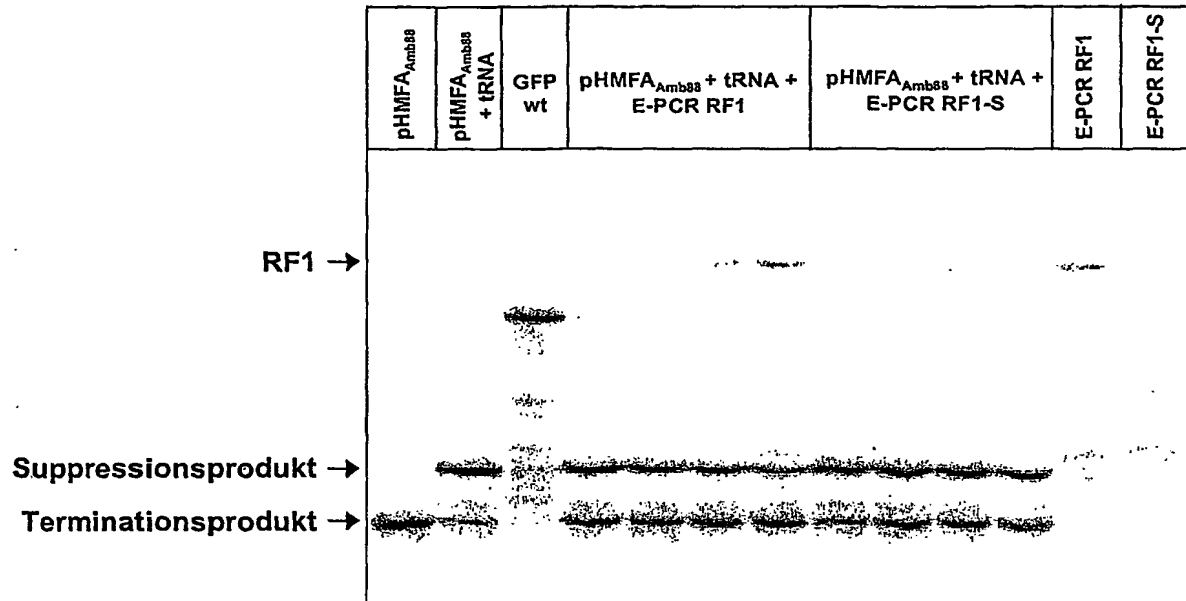
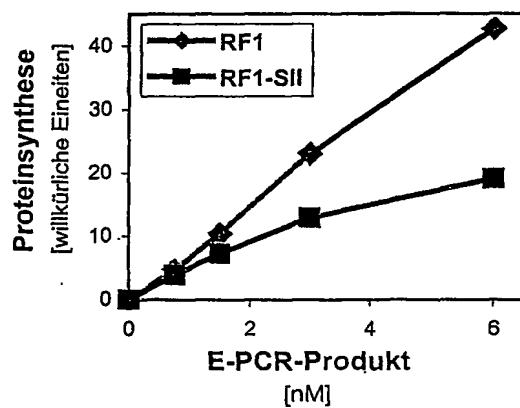
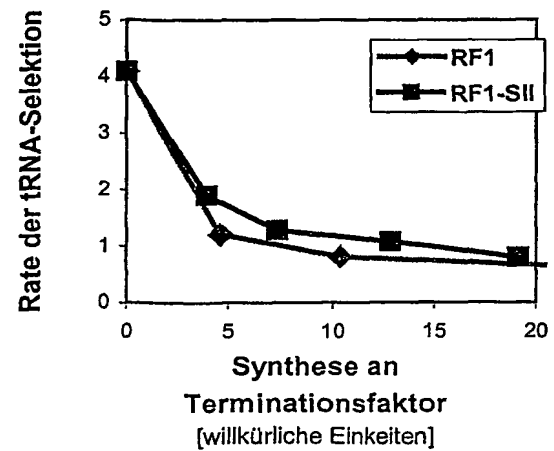
Fig. 4**A** (PhosphorImage)**B****C**

Fig. 5

■ : + 400 mM NaCl (wie Präinkubation)
▨ : ohne NaCl

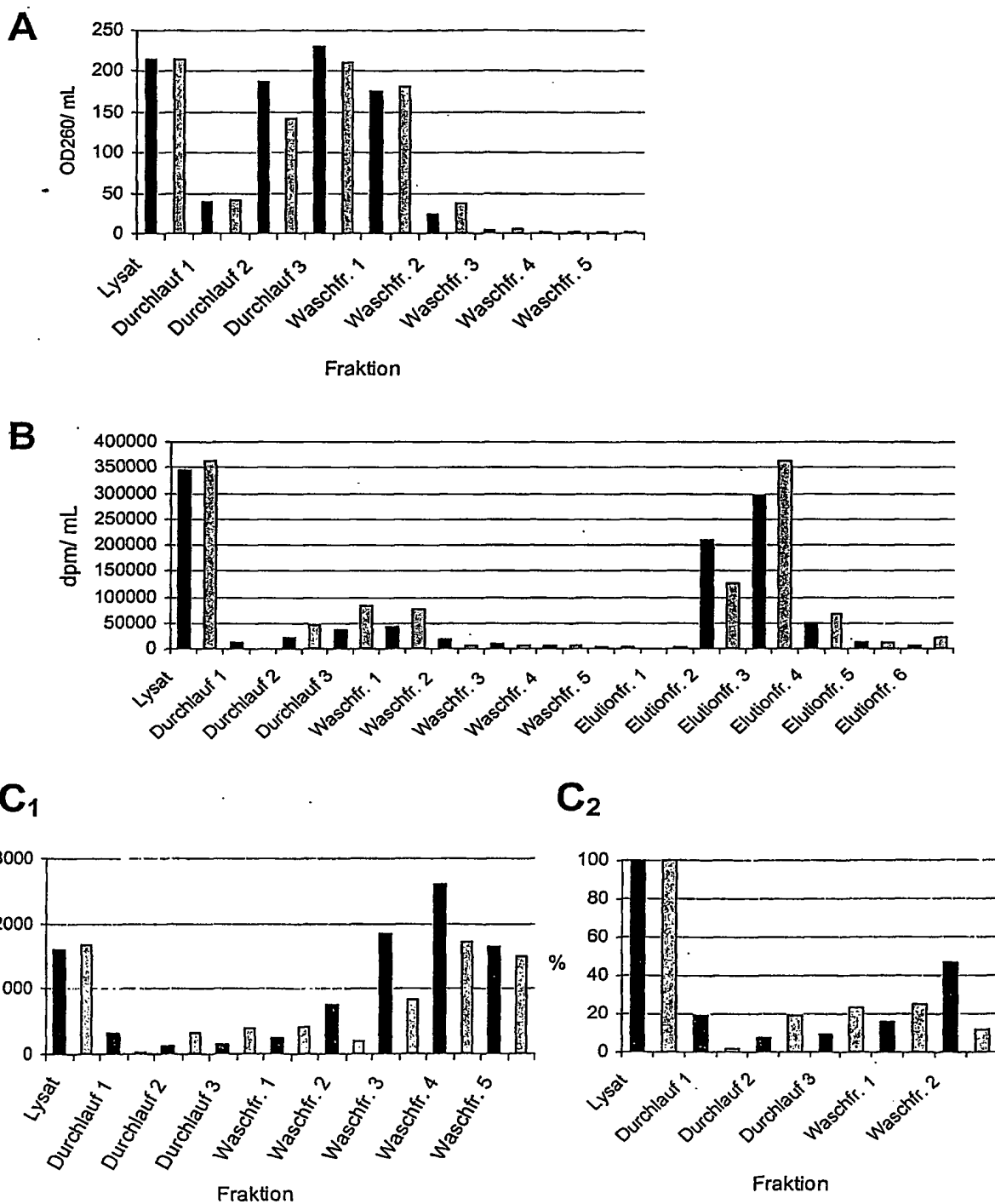


Fig. 6

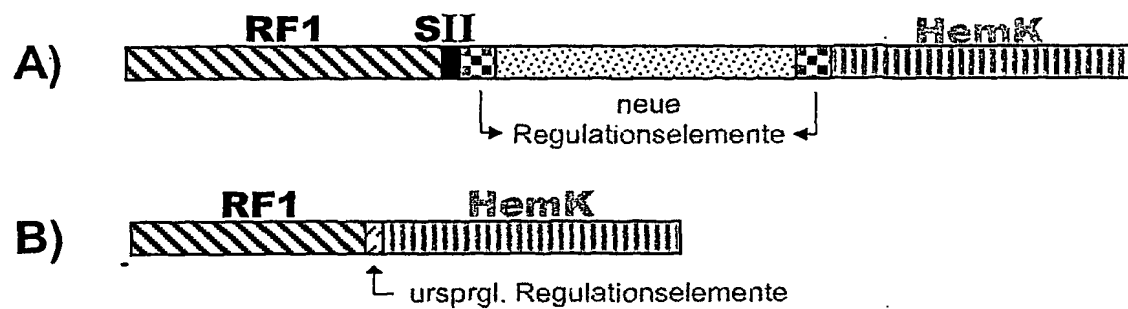


Fig. 7

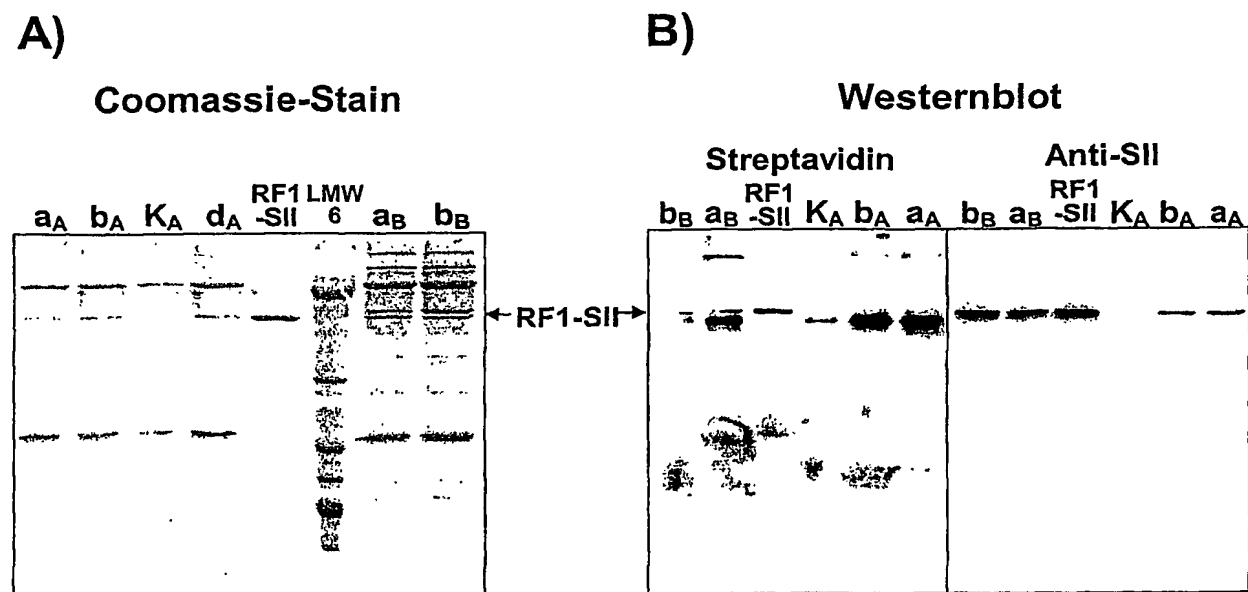


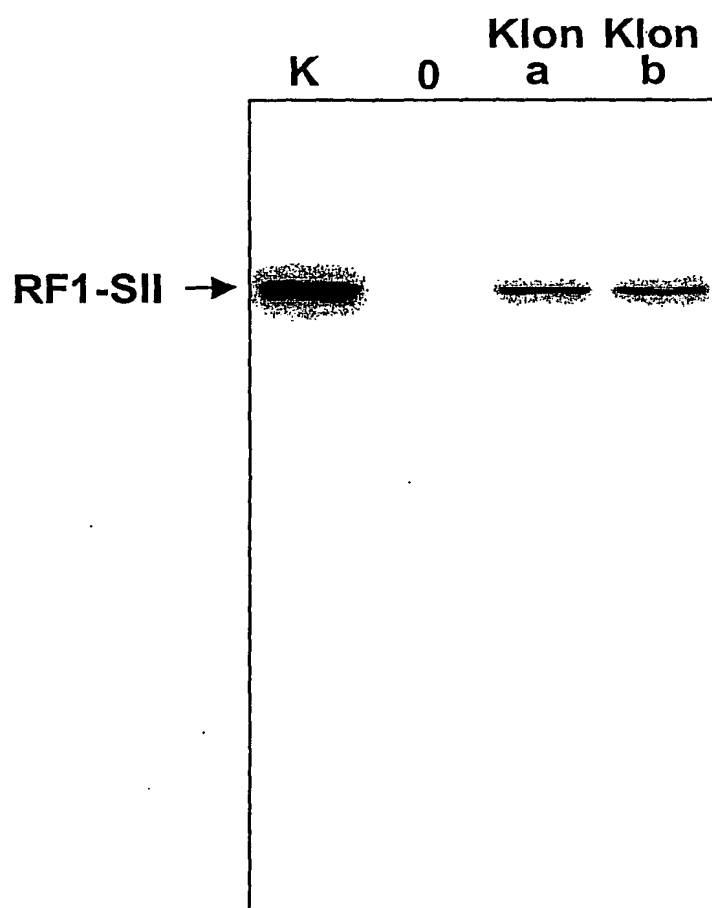
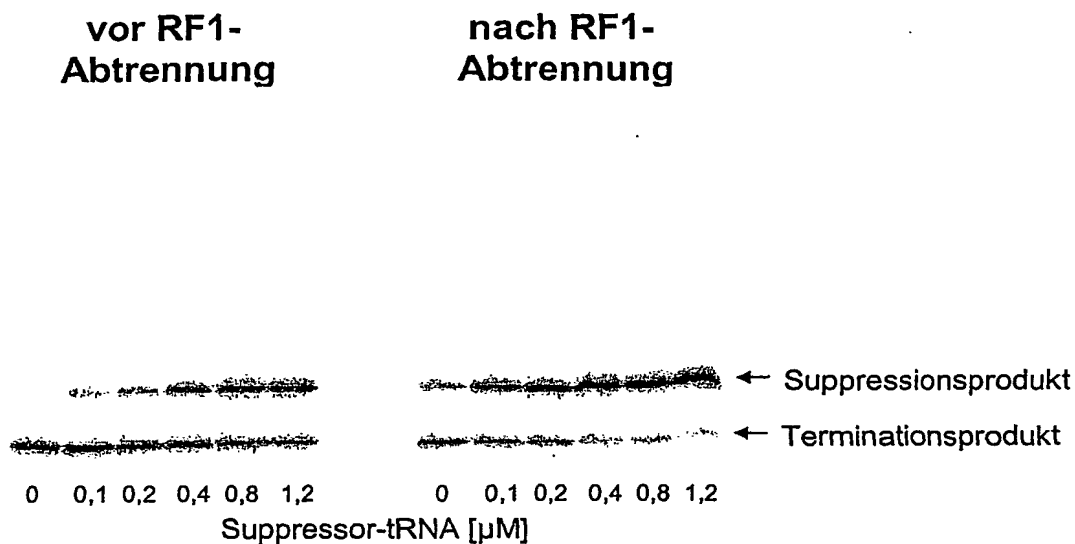
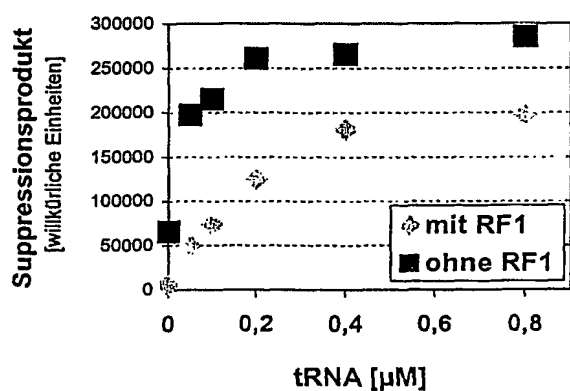
Fig. 8

Fig. 9

A



B



C

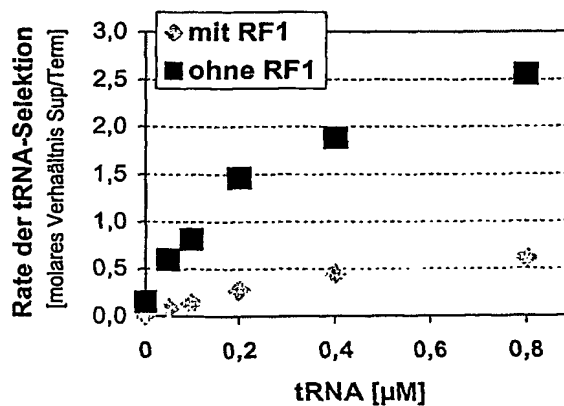
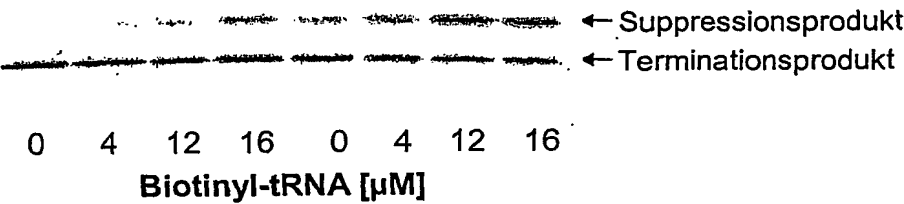


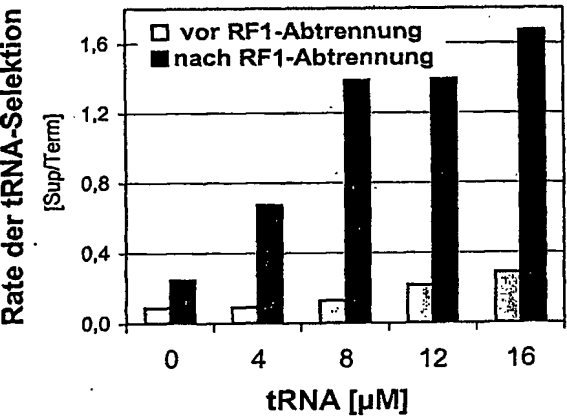
Fig. 10

A

vor RF1-Abtrennung | nach RF1-Abtrennung



B



C

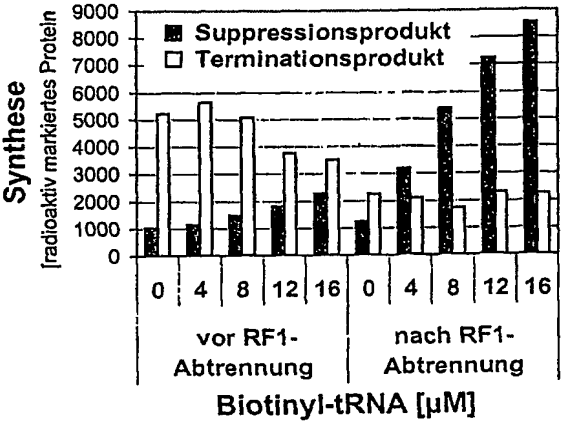


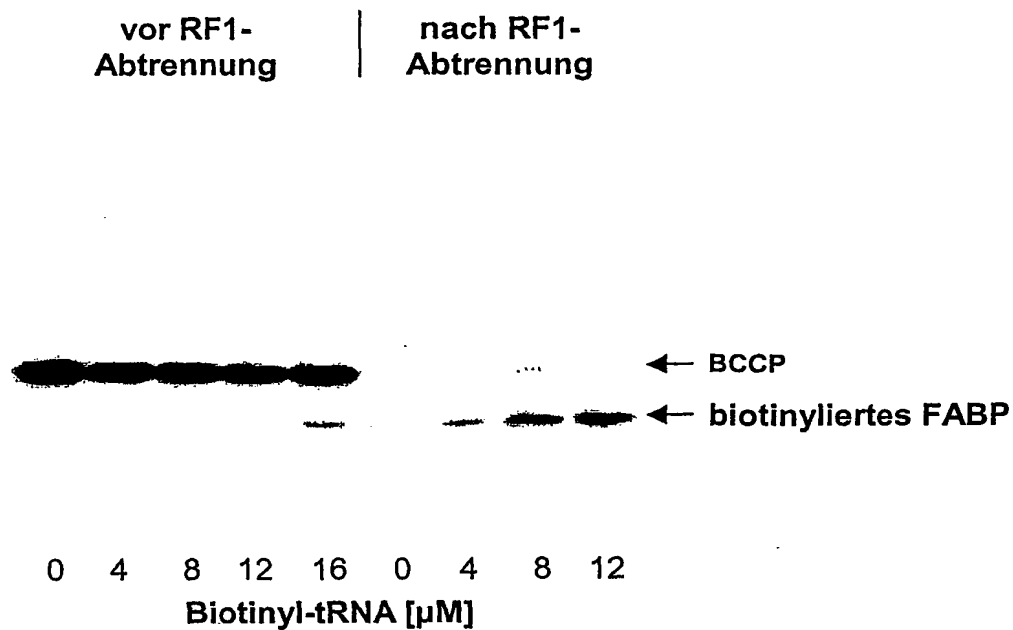
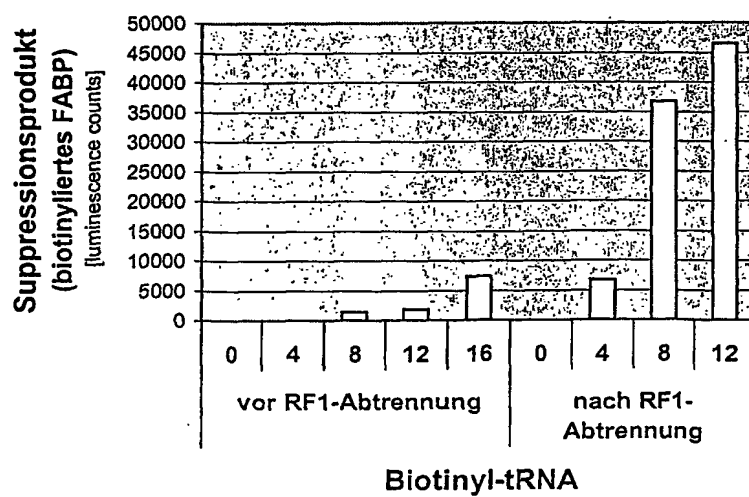
Fig. 11**A****B**

Fig. 12